Manuel d’utilisation du vidéo-microscope 3

04/12/2008

Allumage du système **2**

Mise en place de l'échantillon, positionnement de l'optovar **5**

Passage du système en mode oculaires-transmission **6**

Passage du système en mode oculaires-fluorescence **7**

Passage du système en mode Acquisition **8**

Echantillonnage spatial, dynamique des images **9**

Sauver les images **11**

Acquérir une image **12**

Acquérir plusieurs couleurs **14**

Acquérir une série Z **16**

Acquérir un timelapse **18**

Acquérir plusieurs positions de platine **19**

Acquisition multidimensionnelle **20**

Eteindre le système **22**

Allumage du système

1. Allumer la lampe à fluorescence (sur l'étagère à droite) et mettrela puissance sur le premier cran.

2. Allumer la multiprise marquée "VM3", par terre à droite.

Le microscope, la caméra, le pilote des roues d'émission/excitation, et la platine motorisée y sont reliés.
La "mise en marche " de cette multiprise allume tous ces éléments.

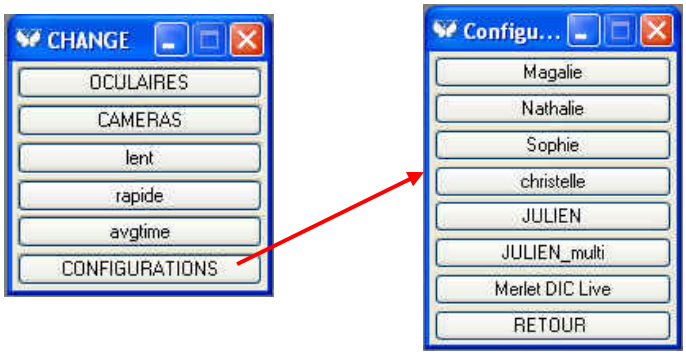
3. Allumer le PC (sous la table)

4. Sur le PC, « Loggez » vous en utilisant la session de votre groupe. S'il n'en existe pas, adressez vous à l'équipe de la PF (web.imagerie@ijm.jussieu.fr)

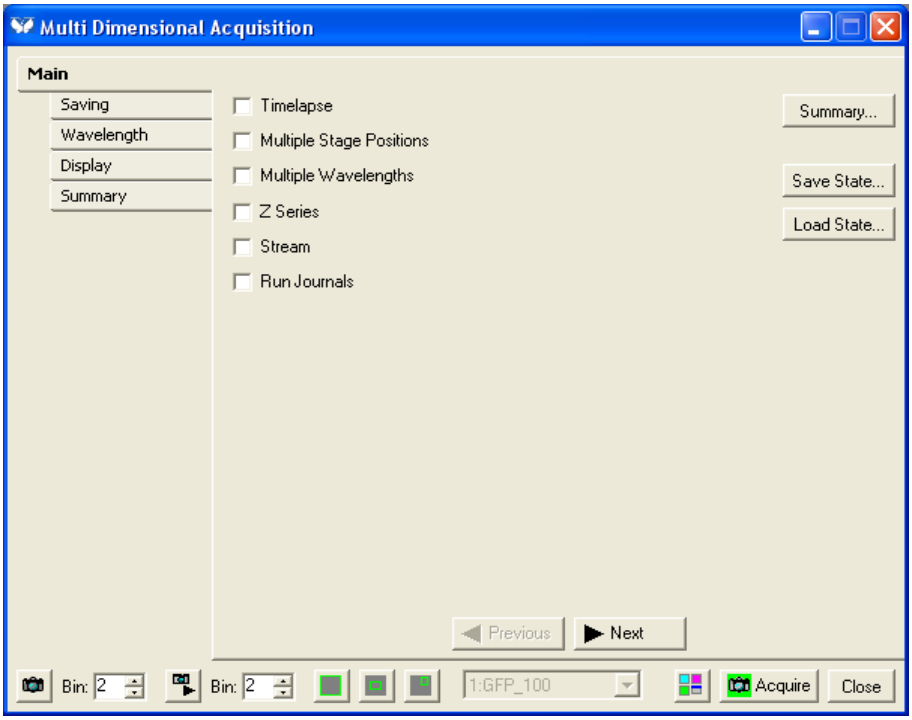
5. Lancer Metamorph 7.0

6. Vérifier que la barre de journaux (*Taskbar*) est apparente, sinon l'afficher en allant dans le menu : *Journal/Show Taskbar (ou F4)*

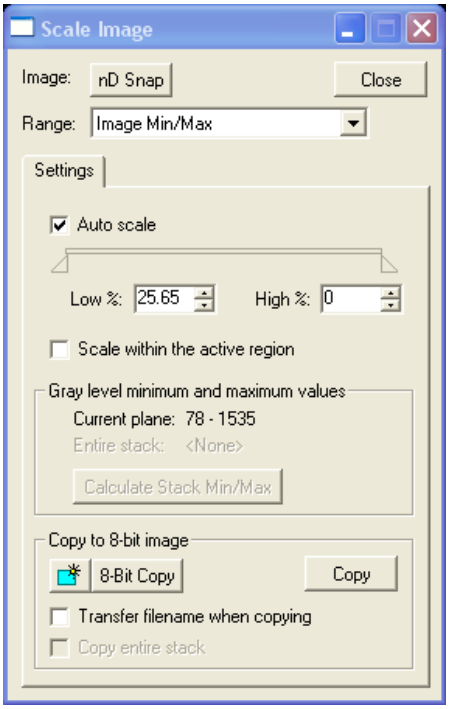
7. Si une configuration est déjà enregistrée à votre nom, cliquez sur CONFIGURATIONS puis sur votre nom. Tous les paramètres de votre acquisition sont alors chargés.



8. Lancer la boite Multidimensional acquisition (*Apps/Multidimensionnal Acquisition*)

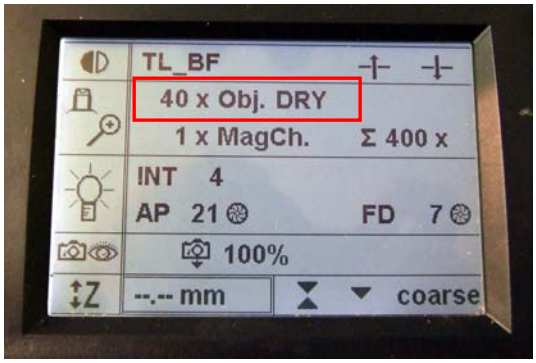


9. Afficher la boite Scale Image *(Display/Scale Image)*



Mise en place de l'échantillon, positionnement de l'optovar

1. Sélectionner l'objectif désiré à l'aide des boutons situés sur le joystick, à gauche. L'objectif en place est indiqué sur l'écran du microscope.



2. Selon l'objectif utilisé, mettre/enlever l'optovar dans la bonne position à l'aide des boutons situés en façade du microscope (respectivement gauche/droit):

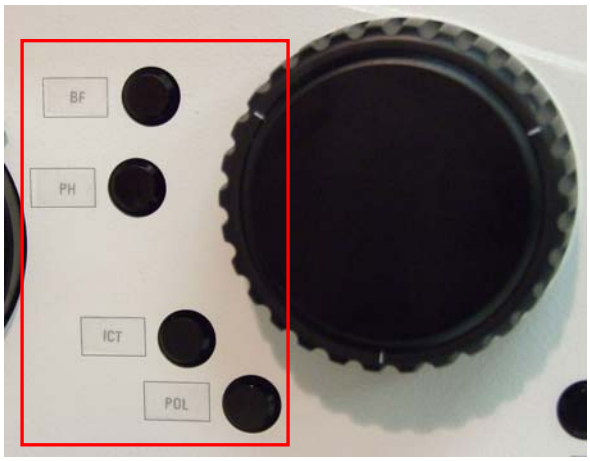
Objectif	Optovar
20x	1.6 X
40x	1.6 X
63x	1 X
100x	1 X

3. Mettre en place l'échantillon en utilisant le support universel, ou la platine chauffante (sans oublier l'huile ou l'eau pour les objectifs à huile ou à eau !!)

Passage du système en mode oculaires-transmission

1. Dans Metamorph, sur la Taskbar, cliquer sur OCULAIRES, pour avoir l'image aux oculaires.

2. Au niveau du microscope, à l'aide des boutons situés derrière la vis de mise au point de gauche, cliquer sur BF (BrightField), ou Ph (Contraste de phase), ou ICT (DIC, Nomarski), ou POL (seulement polariseur et analyseur) selon le mode de contraste désiré.



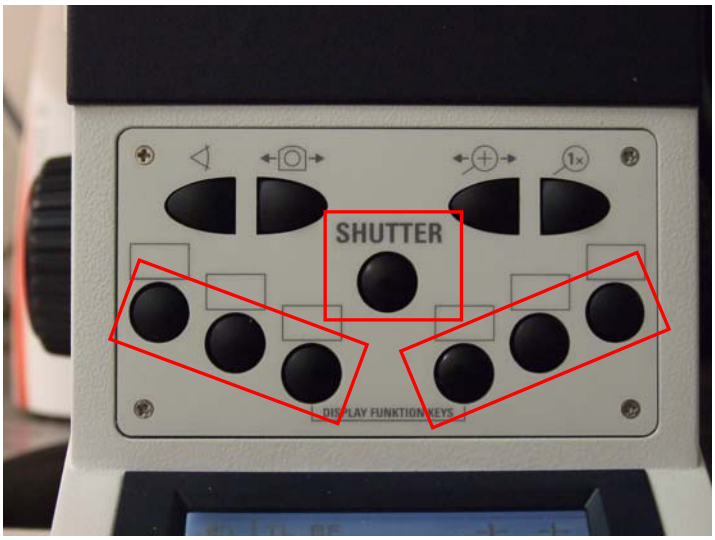
3. Ouvrir le shutter à l'aide du bouton situé en façade du microscope

N.B : Attention, si le grossissement de l'objectif clignote à l'écran, c'est que l'objectif n'est pas adapté au mode de contraste demandé.

Passage du système en mode oculaires-fluorescence

1. Dans Metamorph, sur la Taskbar, cliquer sur OCULAIRES, pour avoir l'image aux oculaires.

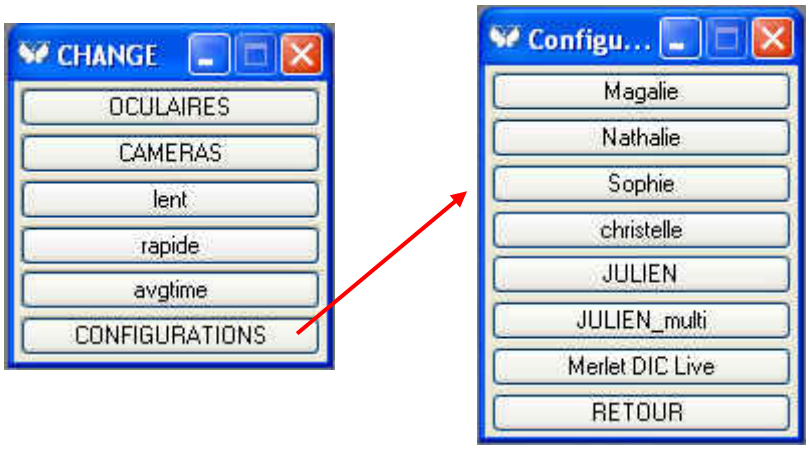
2. Au niveau du microscope, cliquer sur une des positions de filtres de fluorescence
3. Ouvrir le shutter



Passage du système en mode Acquisition

1. Sur la Taskbar, cliquer sur CAMERAS, pour avoir l'image à l'écran.

2. Sur la Taskbar, cliquer sur CONFIGURATIONS, puis sur votre nom pour charger votre propre configuration d'acquisition.



Ou : charger les paramètres d'acquisitions enregistrés lors de votre précédente séance en cliquant sur *Load State* dans l'onglet *Main* de la *Multi Dimensional Acquisition*

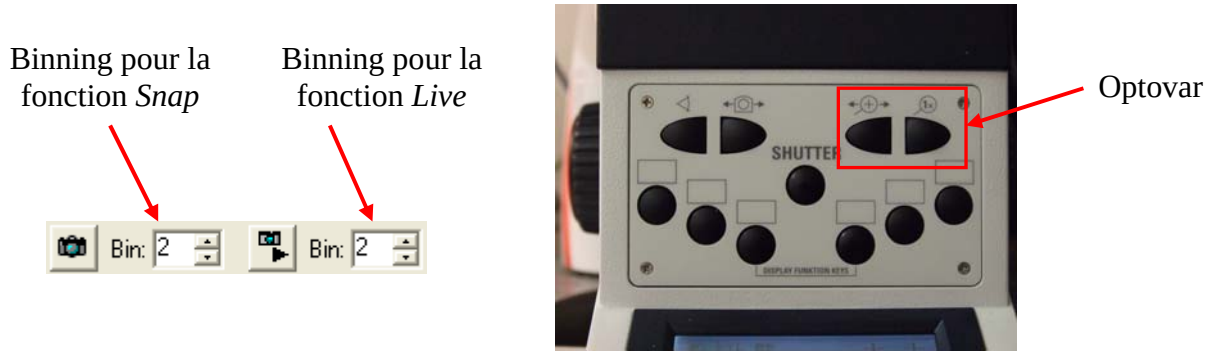
N.B : si vous n'avez pas de configuration enregistrée, vous devez créer vos propres paramètres, puis les sauver en cliquant sur *Save State.*

Echantillonnage spatial, dynamique des images

Echantillonnage spatial

En xy
Appliquer la bonne valeur de binning et vérifier la position de l'optovar en fonction de l'objectif utilisé.

Objectif	NA	Immersion	Optovar	Binning
100x	1.4	huile	1	2
63x	1.32	huile	1	1
63x	1.2	eau	1	1
40x	1.25	huile	1.6	1
20x	1.25	Huile ou eau	1.6	1



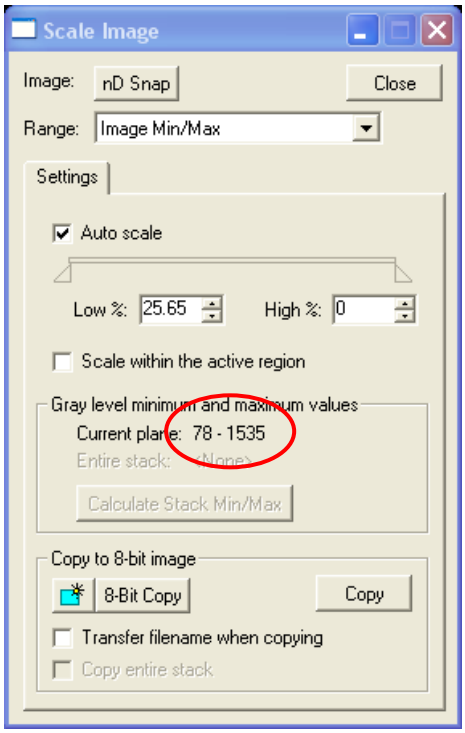
Remarque *:*
Ces valeurs de binning sont choisies pour numériser de façon optimale l'image en fonction du pouvoir résolutif de l'objectif utilisé. La sensibilité de détection de la caméra et sa rapidité de lecture augmentant selon le carré du binning, il peut être intéressant dans certains cas (signaux faibles, besoin de rapidité) de sous échantillonner le signal en travaillant à un binning plus élevé.
N'hésitez pas à demandez conseil aux ingénieurs de la plate-forme !

En xz,
La meilleure valeur de *Step Size* à appliquer est fonction de l'objectif utilisé :

Objectif	Step Size optimum
100x (ou 63x à huile)	0.3 µm
40x à huile	0.4 µm
20x multi immersion	1.3 µm

Remarque :
Ces valeurs sont choisies pour numériser de façon optimale l'image en fonction du pouvoir résolutif de l'objectif utilisé. Il peut être intéressant dans certains cas de sous échantillonner ou de sur échantillonner le signal.
N'hésitez pas à demander conseil aux ingénieurs de la plate-forme !

Dynamique de l'image

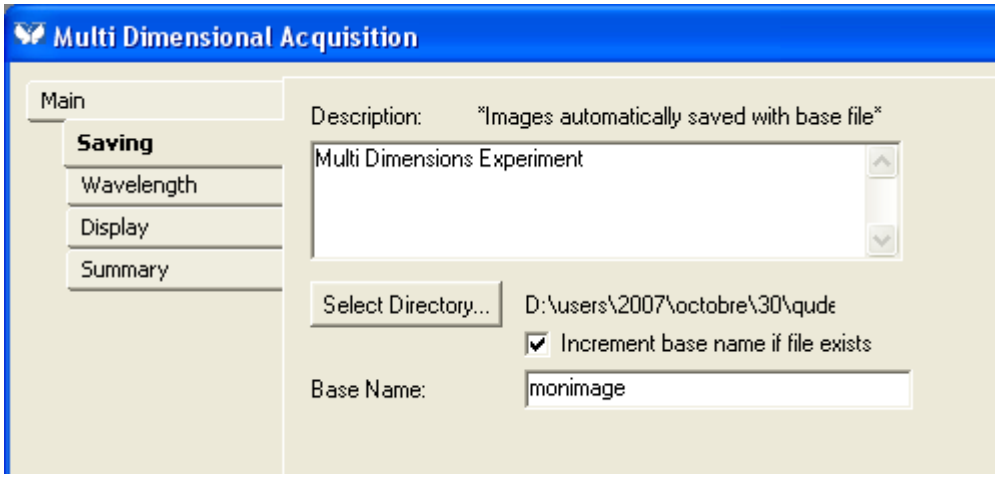


Le maximum de l'image ne doit <u>jamais</u> atteindre 4095.
Plus la dynamique de l'image est importante (différence entre intensité maximum et intensité minimum ; dans cet exemple : 1535-78=1457 niveaux) meilleure est l'image.
Une dynamique de 300 niveaux est suffisante en cellule vivante.
Une dynamique de 1000 niveaux est suffisante en cellule fixée.
Si la dynamique de l'image est trop faible, augmentez le temps d'exposition ou la puissance de la lampe à fluorescence.

Attention !!
Plus on éclaire un échantillon, plus on le détruit…
Pour choisir le bon compromis, n'hésitez pas à demander conseil à un ingénieur de la plate-forme.

Sauver les images

1. Cliquer sur l'onglet *Saving* de la boite *Multi Dimensional Acquisition*



2. Cliquer sur *Select Directory* et choisir le dossier dans lequel sauvegarder les images

Sélectionner le chemin suivant : D://*users / « année » / « mois en cours » / « jour de la manip » / « dossier à votre nom »*

3. Dans la fenêtre *Base Name*, indiquer le nom de l'image.
Lorsque la case *Increment base name if file exists* est sélectionnée l'incrémentation du nom de fichier se fait automatiquement (exemple : si GFP-H2B existe, Metamorph appellera le fichier suivant GFP-H2B-1, puis le suivant GFP-H2B-2… etc)

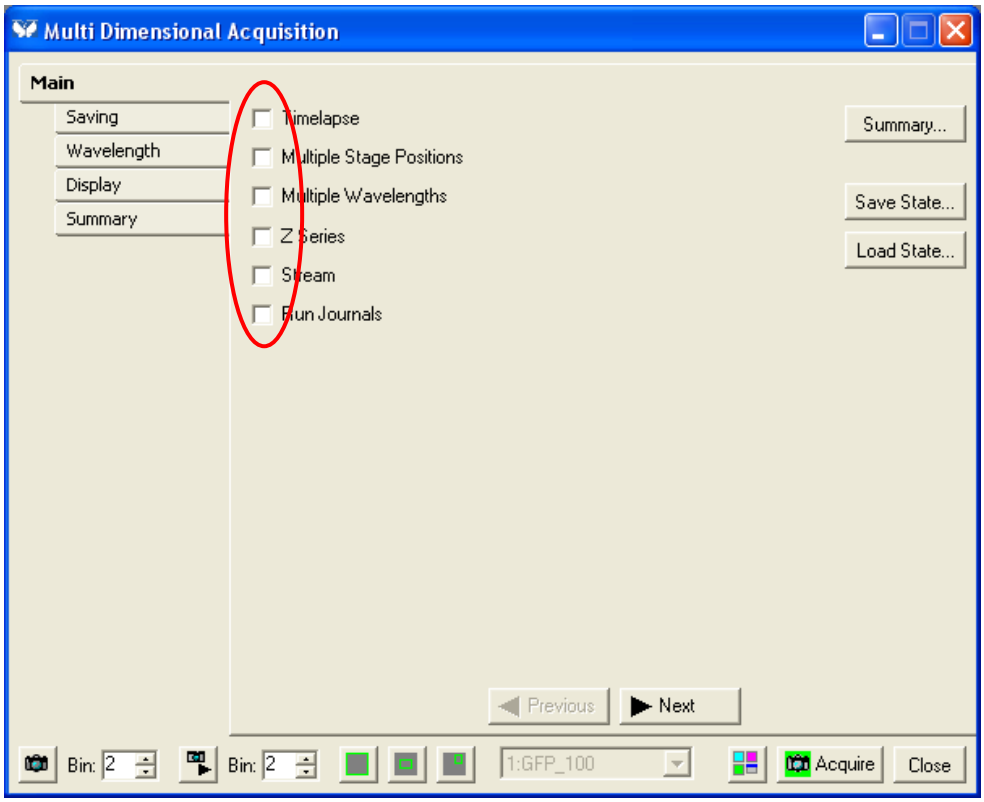
4. Les images sont sauvegardées automatiquement à la fin de leur acquisition.

Remarque :
Les stacks sont sauvés en un fichier .tif qui contient tous les plans du stack.

Attention !!!
Les images sauvées dans un autre répertoire ou datant de plus de 15 jours sont détruites automatiquement et sans préavis.

Acquérir une image

1. Dans l'onglet *Main* de la boite *Multi Dimensional Acquisition,* vérifier que rien n'est sélectionné



2. Cliquer sur l'onglet *Wavelength* de la boite *Multi Dimensional Acquisition*

a). Dans la fenêtre *Illumination*, choisir le mode d'illumination (GFP, RFP, Cy5, DIC, …).

b). Dans la fenêtre *Exposure*, choisir le temps d'exposition (200 ms)

c). Vérifier que les fonctions d'*Auto-focus* et d'*Auto-exposure* ne sont pas activées (*No Auto Expose, No Auto Focus*)

d). Cliquer sur *Live* et trouver le plan d'intérêt avec les flèches montante et descendante.

3. Cliquer sur *Snap*

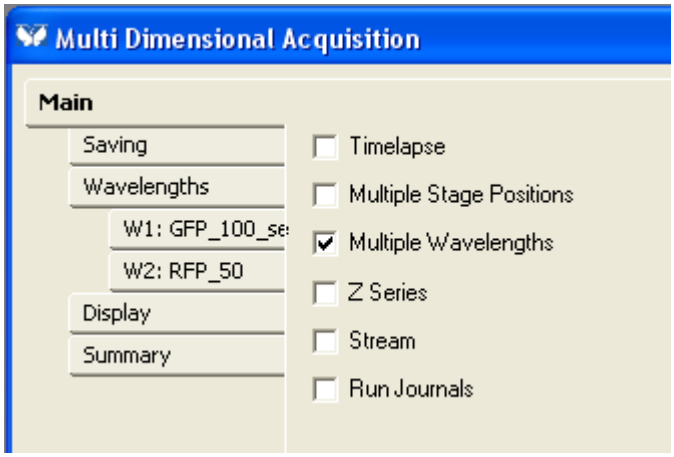
4. Vérifier le nombre de niveaux de gris dans l'image (boite *Scale Image*), voir page 9.

5. Cliquer sur *Acquire* pour acquérir l'image.

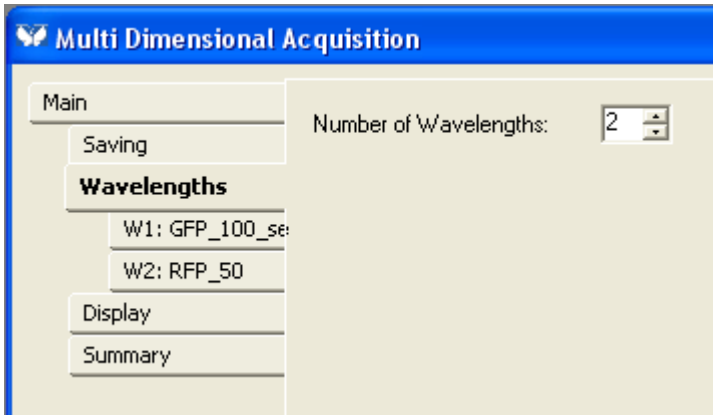
6. Si besoin, cliquer sur *Save State* dans l'onglet *Main* de la *MDA* pour sauvegarder vos paramètres d'acquisition.

Acquérir plusieurs couleurs

1. Dans l'onglet *Main* de la boite *Multi Dimensional Acquisition* sélectionner *Multiple Wavelengths*



2. Cliquer sur l'onglet *Wavelengths* de la boite *Multi Dimensional Acquisition* et choisir le nombre de types d'illuminations à utiliser.



3. Pour chaque onglet (W1, W2) créé :

a). Dans la fenêtre *Illumination*, choisir le mode d'illumination (GFP, RFP, Cy5, DIC, …).

b). Dans la fenêtre *Exposure*, choisir le temps d'exposition (ici, 200 ms)

c). Vérifier que les fonctions d'*Auto-focus* et d'*Auto-exposure* ne sont pas activées (*No Auto Expose, No Auto Focus*)

d). Cliquer sur Live et trouver le plan d'intérêt avec les flèches montante et descendante.

e). Cliquer sur *Snap*

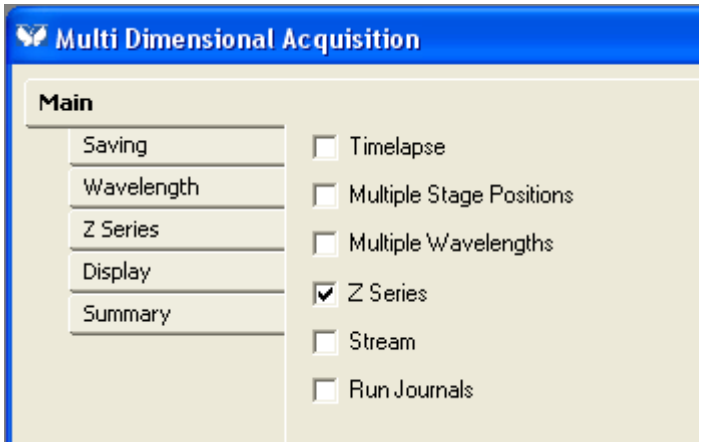
f). Vérifier le nombre de niveaux de gris dans l'image (boite *Scale Image*) voir page 9.

4. Lancer l'acquisition en cliquant sur *Acquire*

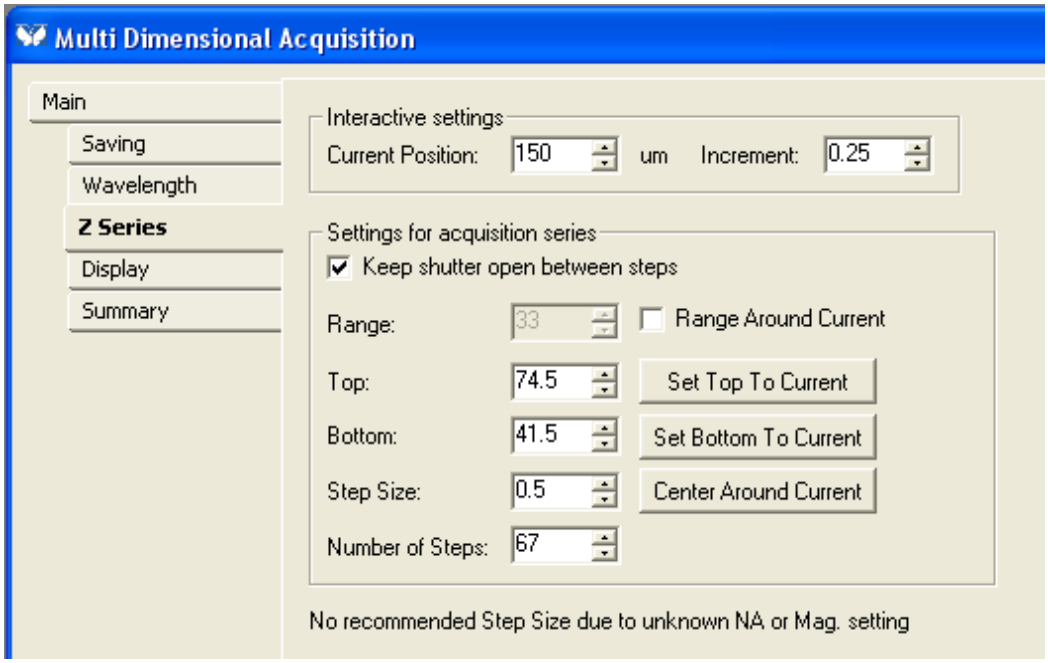
5. Si besoin, cliquer sur *Save State* dans l'onglet *Main* de la *MDA* pour sauvegarder vos paramètres d'acquisition.

Acquérir une série Z

1. Dans l'onglet *Main* de la boite *Multi Dimensional Acquisition* sélectionner *Z Series*



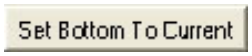
2. Cliquer sur l'onglet *Z Series* de la boite *Multi Dimensional Acquisition*



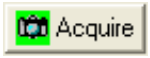
3. Cliquer sur *Live*

4. En utilisant les flèches montantes et descendantes déplacer l'objectif jusqu'à la limite supérieure de la région de l'échantillon à imager.

5. La définir comme *Top* en cliquant sur la touche *Set Top to Current*

6. Procéder de façon identique pour définir la limite inférieure de la région d'acquisition (cliquer sur *Set Bottom to Current*) 

7. Définir la distance entre deux coupes optiques (*Step Size*). Le nombre de plans est défini automatiquement en cliquant sur la case *Number of Steps*

8. Lancez l'acquisition en cliquant sur *Acquire* 

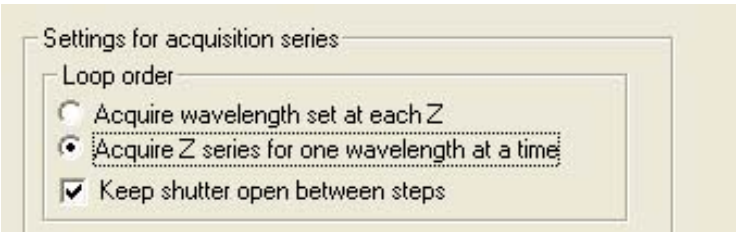
9. Si besoin, cliquer sur *Save State* dans l'onglet *Main* de la *MDA* pour sauvegarder vos paramètres d'acquisition.

***Remarques* :**

-Les réglages de temps d'exposition doivent être effectués dans le plan le plus intense de l'échantillon.

-Les paramètres de la série peuvent également être définis en cochant la case *Range Around Current.* Dans ce cas, indiquer l'épaisseur dans la fenêtre *Range*, puis le *Step Size*. Le nombre de plans à effectuer est défini automatiquement en cliquant sur la fenêtre *Number of Steps*.

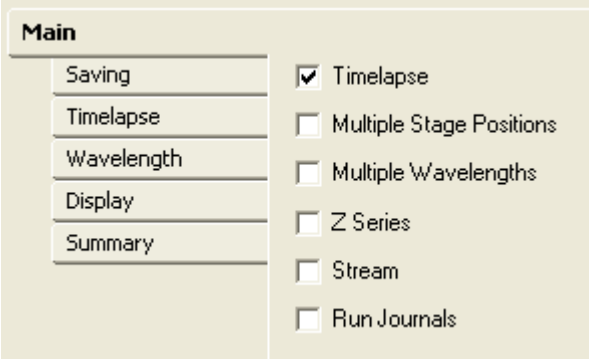
-En cas d'acquisition de séries Z multi-couleurs sur des échantillons fixés, cocher les cases *Acquire Z series for one wavelength at a time* et *Keep shutter open between steps*.
-En cas d'acquisition de séries Z multi-couleurs sur des échantillons vivants, cocher la case *Acquire wavelength set at each Z.*


Settings for acquisition series
Loop order
Acquire wavelength set at each Z
Acquire Z series for one wavelength at a time
Keep shutter open between steps

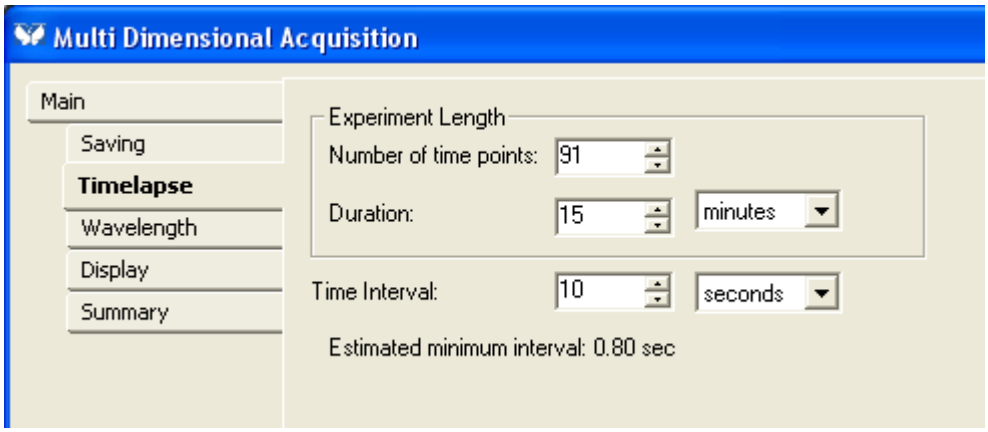
Acquérir un timelapse

Mode classique

1. Dans l'onglet *Main* de la boite *Multi Dimensional Acquisition* sélectionner *Timelapse*



2. Dans l'onglet *Timelapse* de la boîte *Multi-Dimensional Acquisition* sélectionner le nombre de points de temps à réaliser ainsi que l'intervalle de temps souhaité.
   Vérifier que l'intervalle de temps choisi n'est pas inférieur au temps d'acquisition (temps d'acquisition + 160 ms de lecture d'image au maximum)
   Pour plus d'information sur le délai minimum entre deux points de temps, adressez vous aux ingénieurs de la plate-forme



3. Cliquer sur Live et trouver le plan d'intérêt avec les flèches montante et descendante

4. Cliquer sur Snap

5. Vérifier le nombre de niveaux de gris dans l'image (boite *Scale Image*)

6. Lancer l'acquisition en cliquant sur Acquire.

7. Si besoin, cliquer sur *Save State* dans l'onglet *Main* de la *MDA* pour sauvegarder vos paramètres d'acquisition.

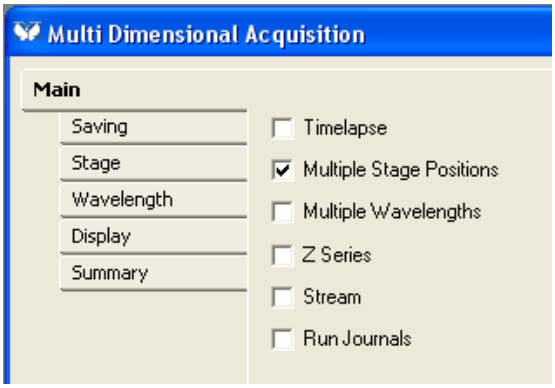
Mode rapide (stream)

Dans le mode Stream, les acquisitions s’enchaînent en continu.
Pendant qu’une image est acquise, la précédente est lue.
Les acquisitions sont plus rapides mais la qualité des images est un peu inférieure.

Pour savoir comment réaliser ce type d'acquisition, prenez contact avec un ingénieur de la plate-forme (web.imagerie@ijm.jussieu.fr) !!!

Acquérir plusieurs positions de platine

1. Dans l'onglet *Main* de la boite *Multi Dimensional Acquisition* sélectionner *Multiple Stage Positions*



2. Dans l'onglet *Stage* de la boîte *Multi-Dimensional Acquisition*:

Le numéro de la position est affiché dans la fenêtre *Position Label*.

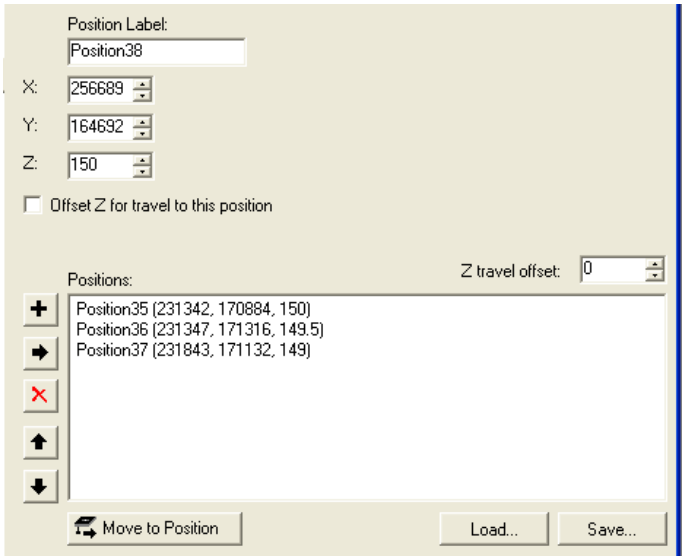
Pour ajouter une nouvelle position, cliquer sur

Le nom de la position ainsi que ses coordonnées X, Y et Z apparaissent alors dans la fenêtre *Positions*.
Attention, si une précédente position est sélectionnée (surlignée en bleu), celle-ci sera écrasée par la nouvelle.

Pour insérer une position entre 2 positions déjà existantes, sélectionner la position supérieure et cliquer sur .

L'acquisition est réalisée en fonction de leur ordre dans la liste. Pour modifier l'ordre d'acquisition des positions, sélectionner les positions d'intérêt et utiliser les flèches et

Pour supprimer une position, la sélectionner et cliquer sur



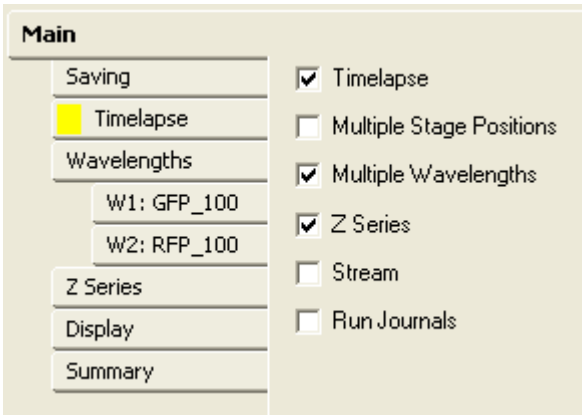
3. Si besoin, cliquer sur *Save State* dans l'onglet *Main* de la *MDA* pour sauvegarder vos paramètres d'acquisition.

Acquisition multidimensionnelle

1. Pour acquérir une série d'images multidimensionnelle (plusieurs fluorochromes ± sérieZ ± time, …), cocher les cases correspondantes dans l'onglet *Main* de la boite *Multi Dimentional Acquisition.*

2. Régler ensuite les différents paramètres comme indiqué dans les chapitres précédents.

Par exemple, pour une acquisition 2 fluorochromes + série temps + série Z :



Eteindre le système

Regarder sur le planning (http://imagpresa.ijm.jussieu.fr/week.php?room=3) si le système est utilisé après votre session ou non.

Si le système est utilisé :
1. Quitter Metamorph (*File/Close*)
2.Transférer ou graver les données
3.Sortir de la session de votre groupe (menu Démarrer/ Fermer la session)

Si le système n'est pas utilisé :
1.Quitter Metamorph (*File/Close*)
2.Transférer ou graver les données
3.Eteindre le PC (menu Démarrer/ Turn Off)

4.Eteindre la multiprise marquée "VM3" par terre à droite.

5.Remettre la puissance de la lampe à fluorescence au minimum puis l'éteindre (sur l'étagère à droite)